



ESPECIES DE
TRICHURIS AISLADAS
DE PRIMATES DE PARQUES
ZOOLOGICOS DE ESPAÑA



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

Julia Rivero Fernández

Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia
Trabajo Fin de Grado
Grado en Farmacia



“ESPECIES DE *TRICHURIS* AISLADAS DE PRIMATES DE PARQUES ZOOLOGICOS DE ESPAÑA”

Departamento de Microbiología y Parasitología
TFG de tipo experimental

Tutoras:
Cristina Cutillas Barrios y Rocío Callejón Fernández

Julia Rivero Fernández
Sevilla, Julio de 2018

Resumen

En el presente Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo un estudio epidemiológico, morfo-biométrico y molecular de especies de *Trichuris* aisladas de primates de distintos zoológicos de España.

Las especies pertenecientes al género *Trichuris* son responsables de la enfermedad denominada Tricocefalosis o tricuriasis. Hasta hace unos años se consideraba a *Trichuris trichiura* como la especie parásita de primates y humanos, no obstante, el descubrimiento de nuevas especies de este género en estos hospedadores ha promovido el estudio de éstas por su importancia zoonótica.

Se ha realizado un estudio epidemiológico de diversos primates que viven en cautividad en 7 zoológicos de España. La prevalencia de *Trichuris* sp. en dichos primates ha sido del 7 % de las muestras totales analizadas. En las diferentes muestras se han encontrado huevos de *Trichuris* sp. en heces de *Macaca sylvanus*, *Cercopithecus neglectus*, y *Colobus guereza kikuyensis*.

Se ha realizado una identificación morfológica y un estudio biométrico de los huevos aislados de las heces de cuatro hospedadores, y de adultos de *Trichuris* sp. obtenidos de un *Macaca sylvanus* procedente del Zoo de Castellar. Los resultados obtenidos han sido comparados con los citados para otras especies de *Trichuris* sp., observándose una similitud de los huevos de *Trichuris* sp. de *M. sylvanus* con los de *Trichuris trichiura*.

Para completar el análisis, se ha realizado un estudio molecular y filogenético de diferentes muestras de huevos y adultos de *Trichuris* sp. de *M. sylvanus*. Los resultados obtenidos parecen sugerir la presencia de *T. trichiura* en este hospedador primate.

Palabras clave: *Trichuris* sp., zoológico, primates, *Macaca sylvanus*.

Índice

1. Introducción	5
1.1. Tricuriasis	5
1.1.1. Taxonomía basada en datos morfológicos	7
1.1.2. Taxonomía molecular	9
1.1.3. Importancia sanitaria	10
2. Objetivos del TFG	12
3. Metodología	13
3.1. Material	13
3.2. Métodos	16
3.2.1. Estudios epidemiológicos	16
3.2.2. Identificación morfológica y estudios biométricos de huevos y adultos de <i>Trichuris</i> sp.	17
3.2.3. Estudios moleculares y filogenéticos	18
3.2.3.1. Selección de marcadores moleculares.....	19
3.2.3.2. Extracción del ADN	19
3.2.3.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	19
3.2.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	20
3.2.3.5. Purificación y cuantificación del ADN amplificado	22
3.2.3.6. Secuenciación	22
3.2.3.7. Análisis de las secuencias	22
3.2.3.8. Análisis filogenético	23
4. Resultados y discusión	24
4.1. Resultados epidemiológicos	24
4.2. Resultados morfológicos y biométricos	25
4.2.1. Identificación morfológica de adultos del género <i>Trichuris</i> de <i>Macaca sylvanus</i>	25
4.2.2. Identificación morfológica de huevos del género <i>Trichuris</i> de <i>M. sylvanus</i>	26
4.2.3. Estudio biométrico de adultos del género <i>Trichuris</i> de <i>M. sylvanus</i>	27
4.2.4. Estudio biométrico de huevos del género <i>Trichuris</i> de <i>M. sylvanus</i>	30
4.3. Resultados moleculares	31
4.3.1. Estudio filogenético basado en la concatenación de los marcadores mitocondriales (<i>cox1</i> y <i>cytb</i>).....	31
1.1.1. Estudio filogenético basado en la concatenación de los	

	marcadores mitocondriales (<i>cox1</i> y <i>cytb</i>) y ribosómicos (18S e ITS2).....	32
2.	Conclusiones	35
3.	Bibliografía	36

1. Introducción

1.1. Tricuriasis

Las especies pertenecientes al género *Trichuris* son nematodos parásitos causantes de la enfermedad denominada Tricocefalosis, tricuriasis o “enfermedad del gusano látigo” (Bethony et al., 2006).

Más de 60 especies de *Trichuris* se han descrito en una amplia gama de hospedadores mamíferos pudiendo parasitar, una misma especie, a varios hospedadores. Así, *Trichuris suis* ha sido citada como especie parásita de cerdos y jabalíes. También han sido citados hospedadores primates que pueden ser parasitados por varias especies de *Trichuris*, como es el caso de *Trichuris colobae* que parasita a *Colobus guereza kikuyensis* (Cutillas et al., 2014), *Trichuris ursinus* que parasita a *Papio ursinus* (Callejón et al., 2017) y *Trichuris trichiura* que parasita a primates en general y también a humanos (Ooi et al., 1993).

El nombre *Trichuris* procede del griego “trikhos” que significa pelo. Se conoce también como gusano látigo o “whipworm” por la morfología característica del adulto, con su parte anterior muy delgada y alargada y su parte posterior más gruesa y acortada, simulando el mango de un látigo (Figura 1). También presentan una morfología característica los huevos, con una forma típica de barril (John et al., 2006).

T. trichiura fue descrito por primera vez por Roederer en 1761. La tricuriasis tiene una distribución geográfica mundial, pero fundamentalmente prevalece en regiones cálidas y húmedas y en regiones donde hay escasez de saneamiento (John et al., 2006). Estudios recientes estiman que *T. trichiura* infecta a 1049 millones de personas, incluyendo 114 millones de niños en edad preescolar y 233 millones de niños en edad escolar (Khuroo y Khuroo, 2010). *T. trichiura* es el tercer nematodo más común en el mundo después de *Ascaris* y *Enterobius* (Glen y Brooks, 1986).

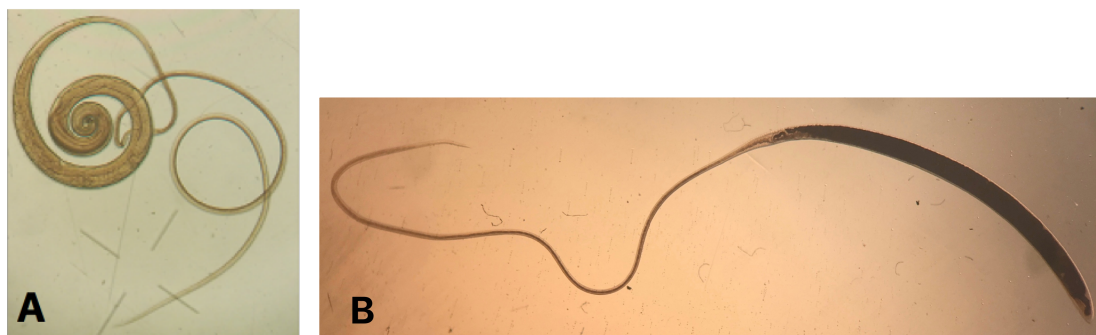


Figura 1. A. Macho de *T. trichiura*, B. Hembra de *T. trichiura*.

Los adultos se localizan enhebrados en la mucosa intestinal del intestino grueso, fundamentalmente en el ciego y realizan una reproducción de tipo sexual (Ash y Orihel, 2010).

T. trichiura es monoxeno, presentando un ciclo biológico directo. Las hembras grávidas, tras la cópula, realizan la ovoposición en el ciego, pudiendo liberar cada hembra



Figura 2. Vagina y parte del útero de la hembra grávida de *T. trichiura*.

entre 3.000 y 20.000 huevos por día, aunque el útero de la hembra puede contener unos 60.000 huevos (Figura 2). Estos huevos sin embrionar salen arrastrados por las heces al medio externo (Callejón, 2012).

Estos huevos inmaduros (sin embrionar) son expulsados a través de las heces del hospedador necesitando un período de 10 días o más en el medio externo, con la temperatura (20-25°C) y humedad adecuada, para alcanzar el estadio infectante (huevo embrionado). Cuando el hospedador ingiere los huevos infectantes, se libera la larva en el duodeno y, tras sucesivas mudas, llegan al ciego donde madura a adulto (Figura 3 A y B) (Callejón, 2012).

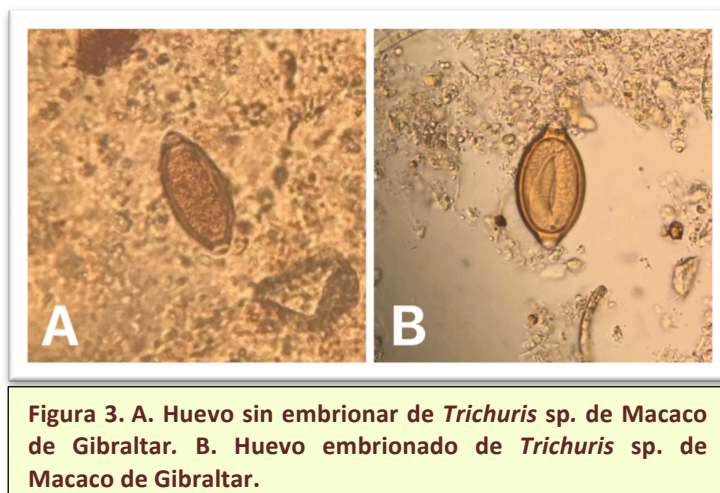


Figura 3. A. Huevo sin embrionar de *Trichuris* sp. de Macaco de Gibraltar. B. Huevo embrionado de *Trichuris* sp. de Macaco de Gibraltar.

Los tricocéfalos se enhebran a la mucosa por la parte anterior del cuerpo del adulto formando un órgano de fijación, resistiendo los movimientos del intestino, que permite el paso de un fermento digestivo secretado por el gusano, que modifica el material de la mucosa en un líquido que puede succionar el parásito (Figura 4). Su vida se prolonga unos 4-6 años, durante los cuales se nutre de la mucosa lisada y la sangre que en ella se extravasa (Gállego Berenguer, 2007; John et al., 2006; Lapage, 1983).



Figura 4. Tricocéfalos enhebrados en el intestino grueso (Baruch, 2000).

Las características clínicas de la enfermedad se asocian con las manifestaciones agudas y crónicas resultantes del parasitismo intestinal por los vermes adultos localizados, generalmente en el colon, y en menor prevalencia en el apéndice y el recto del hospedador humano (Bethony et al., 2006).

El interés renovado del género *Trichuris* es debido a la importancia que ha adquirido en los últimos años como terapia biológica, por la administración de huevos de *T. suis* como tratamiento para enfermedades inflamatorias del intestino (Summers et al., 2005).

1.1.1. Taxonomía basada en datos morfológicos

Durante muchos años, la diferenciación específica del género *Trichuris* ha sido motivo de controversia. *T. suis* ha sido descrita como especie parásita del cerdo y jabalí, mientras que *T. trichiura* ha sido encontrado parasitando a humanos y primates (Cutillas et al., 2009).

La diferenciación específica del género *Trichuris* es muy compleja, ya que la mayoría de sus especies difícilmente pueden diferenciarse, presentando caracteres morfológicos superpuestos (Cutillas et al., 2012).

Roederer, en 1761, fue el primero en citar el género *Trichuris* para nombrar especies con esas características. Muchas especies se asignaron dentro del género *Trichuris* gracias a sus características externas y algunos parámetros biométricos (Dujardin, 1845). Unos autores, consideraron la longitud de la espícula como principal carácter diferencial de machos de las especies de *Trichuris* (Schwartz, 1926). Posteriormente, otros autores afirmaron que la longitud de la espícula era la característica más fiable para la diferenciación masculina, sin embargo otros caracteres necesitan confirmación, como la morfología de los testículos o la longitud de la cloaca (Chandler, 1930; Suriano y Navone, 1994). No obstante, se confirmó la dificultad para diferenciar entre algunas especies. Además, el examen de numerosos especímenes de este género muestra que se superponen la mayoría de los caracteres morfológicos y biométricos (Gagarin, 1974).

Existen varios estudios que se han llevado a cabo para aclarar la sistemática de este género. Los primeros estudios morfológicos sobre los parásitos adultos de *T. suis* y *T. trichiura* determinaban que los dos nematodos tricúridos formaban parte de la misma especie (Creplin, 1825; Leuckart, 1876; Schwartz, 1926). En cambio, otros estudios posteriores, indicaron que

estos dos parásitos sí eran especies distintas (Pavlovsky y Sondak, 1951; Schneider, 1866; Sondak, 1948)

Zaman, para la determinación de los machos de estas especies, estudió la forma de la espícula, la estructura de la vaina de la espícula, y las espinas presentes en ella. De estas últimas, se vio una clara diferencia entre las espinas de la vaina encontradas en *T. suis* y en *T. trichiura* (Zaman, 1984) también aceptado por otros autores (Barus et al., 1977; Lanfredi et al., 1995). Asimismo, estos autores informaron de la ausencia de papilas pericloacales en cualquier grupo de machos de *T. suis* estudiado que, sin embargo, estaban presentes en *T. trichiura* (Gibbons, 1986; Mahmoud, 2002; Ooi et al., 1993; Tenora et al., 1992; Tenora et al., 1988). Por consiguiente, la principal diferencia entre ambas especies se basaba en la presencia o ausencia de papilas pericloacales en el macho de estas especies. Sin embargo, Oliveros et al. (1998) observaron papilas pericloacales en machos de *T. suis* aislados de jabalíes.

Las hembras de tricúridos son más difíciles de diferenciar que los machos y varios autores sugieren la estructura de la vulva para la diferenciación de especies (Barus et al., 1978; Chandler, 1930; Gibbons, 1986; Knight, 1971; Rickard y Bishop, 1991). En un estudio informaron que las hembras de *T. suis* poseían vulva con espinas y *T. trichiura*, sin embargo, carecía de ellas. Posteriormente, Spakulová (1994) descubrió la combinación de siete caracteres métricos para distinguir ambas especies. Unos autores consideraron que, entre los huevos y las larvas infecciosas de *T. trichiura* y *T. suis*, existía una diferencia morfológica de tamaño significativa (Beer, 1976). Sin embargo, otros autores han considerado que no existe dicha diferencia (Cutillas et al., 2014).

Soulsby (1982) observó que *T. trichiura* era morfológicamente similar a *T. suis*, pero era biológicamente distinta, infestando solo a los humanos y a los primates. Otros autores (Horii y Usui, 1985), corroboraron la transmisión de *T. trichiura* de primates a hombres. Además, se sabe que *T. suis* no parasita a humanos, pero si se ingieren huevos larvados, éstos eclosionan y son capaces de colonizar al hospedador sin causar enfermedad, y son eliminados sin tener que usar una terapia específica (Summers et al., 2003).

Debido a la plasticidad fenotípica existente en muchas especies de helmintos, Knight (1971) concluyó que los hospedadores donde viven los parásitos condicionan los caracteres fenotípicos de éstos.

En los últimos años, se han propuesto nuevas especies de *Trichuris* en primates, como *T. colobae*, especie parásita de *C. g. kikuyensis*, un primate no humano (NHP), basándose en caracteres que discriminaban a *T. suis* y *T. trichiura* de *T. colobae* (Cutillas et al., 2014). Otra

nueva especie, *T. ursinus*, especie parásita de *P. ursinus*, mostraba caracteres más cercanos a *T. suis* que a *T. trichiura* (Callejón et al., 2017).

1.1.2. Taxonomía molecular

Los estudios moleculares basados en técnicas de amplificación de ADN, sugieren que *Trichuris* spp. en humanos y NHP representan varias especies que difieren en la especificidad del hospedador (Liu et al., 2013; Ravasi et al., 2012). La hipótesis de la existencia de numerosas especies de *Trichuris* en primates y humanos abre la posibilidad de revisar el potencial zoonótico y la especificidad del hospedador de *T. trichiura* así como de las otras supuestas nuevas especies (Dolezalová et al., 2015). Este tema resulta de gran interés debido a que los parásitos que parasitan a múltiples hospedadores son difíciles de controlar, ya que los reservorios pueden ser una fuente de reinfección para otras poblaciones en las que el parásito ha sido extinguido (Gottstein et al., 2009).

De Ley y Blaxter (2002) basándose en árboles filogenéticos con secuencias de la subunidad pequeña del ARNr, clasificaron al género *Trichuris* como miembro de la Clase Enoplea (Subclase Dorylaimia, Orden Trichinellida). Sin embargo, Liu et al. (2012), tomando como referencia el análisis de datos mitocondriales, situaron *Trichuris* y *Trichinella* como miembros del Orden Trichocephalida separados de los otros grupos de Dorylaimia. Asimismo, Callejón et al. (2013), basándose en estudios filogenéticos de las secuencias del gen de la citocromo oxidasa 1 (*cox1*) del ADN mitocondrial (ADNmt) y el gen 18S del ADN ribosómico (ADNr), otorgaron un fuerte apoyo a la monofilia del género *Trichuris*, que quedaría separado de otros nematodos enopleos, incluyendo Dorylaimida y Mermithida.

En el año 2012, Ravasi y colaboradores propusieron el requerimiento de un análisis morfológico de las muestras de adultos del género *Trichuris* recolectados de *P. ursinus* para determinar si los linajes genéticos se corresponden con diferentes especies morfológicas. Posteriormente, dicho estudio se llevó a cabo por Callejón et al. (2017) y se demostró que *T. ursinus* es una especie que difiere significativamente de *T. trichiura* y *T. colobae*, presentando caracteres más cercanos a *T. suis*.

Varios estudios han demostrado que los Espaciadores Transcritos Internos (ITS) del ADNr son marcadores genéticos fiables para poder distinguir entre especies estrechamente relacionadas de nematodos. Sin embargo, las secuencias de regiones que codifican el ARNr parecen ser menos fiables para la diferenciación de especies debido a un nivel bajo de divergencia de la secuencia (Cutillas et al., 2009). Posteriormente, diversos estudios demostraron que el gen 18S ADNr era útil para evaluar relaciones filogenéticas entre las

especies de *Trichuris*, y además que estas secuencias son ventajosas frente a las secuencias de ITS porque están menos sujetas a problemas de alineaciones múltiples ambiguas. También se ha utilizado la secuencia del gen *cox1* para estudiar dichas relaciones, pero resultó ser más fiable utilizando la combinación de ambos genes (18S ADNr y *cox1* ADNmt) (Callejón et al., 2013).

La amplificación de distintos marcadores moleculares (ITS1, 5,8S e ITS2) ha permitido el descubrimiento de nuevas especies del género *Trichuris*, como es *T. colobae* aislado de primates (*C. g. kikuyensis* y *Nomascus gabriellae*). Las secuencias obtenidas mostraron claras diferencias con respecto a las de *T. suis* de cerdo y jabalí, concluyendo que *T. suis* y *T. colobae* de *C. g. kikuyensis* y *N. gabriellae* son especies genéticamente diferentes, y pueden discriminarse por digestión enzimática específica de productos de ADN amplificados a partir de las secuencias obtenidas de estos marcadores del ADNr (Cutillas et al., 2014).

En otro estudio reciente, Callejón et al. (2017) presentaron una hipótesis filogenética molecular del género *Trichuris* basada en datos de secuencias del ADNmt, a partir del gen *cox1* y del ADNr, como el gen 18S. Este análisis mostró que *T. ursinus* estaba estrechamente relacionado con *T. suis* y no tanto con *T. colobae*. Estos autores demostraron que los genes del ADNr (18S) y del ADNmt (*cox1*), proporcionan una resolución en varios niveles, pero juntos resuelven las relaciones entre poblaciones geográficas y especies del género *Trichuris*.

1.1.3. Importancia sanitaria

Las enfermedades humanas de origen animal (zoonosis) comprenden más de 150 infecciones de diversa etiología. También forman una proporción considerable de las nuevas enfermedades emergentes y reemergentes (Acha y Szyfres, 2001; Meslin, 1995; Schwabe, 1984; WHO, 1996). La separación espacial existente entre humanos y NHP, el contacto ecológico indirecto establecido a través de vectores y medios ambientales como el agua y el suelo son factores importantes en la perpetuación de infecciones, muchas de las cuales afectan comúnmente a los humanos (Acha y Szyfres, 2001; Meslin, 1995; Schwabe, 1984; WHO, 1996). Además, la proximidad filogenética entre los NHP y el hombre plantea mayores desafíos para la salud pública, especialmente cuando los NHP son mascotas, se utilizan en investigación (animales de laboratorio) o cuando la proximidad ecológica se establece como resultado de la invasión de hábitats de primates. Esto significa que hay una mayor necesidad de recopilar información sobre las enfermedades naturales de los primates que pueden ser una amenaza para la salud humana o la conservación de los primates a nivel regional (Muriuki et al., 1998)

Los parásitos se encuentran entre las causas más importantes de salud precaria en todo el mundo (Warren, 1988). Su presencia en los NHP de rango libre en un país donde la higiene ambiental y la infraestructura de salud pública adecuada no se han logrado, puede tener implicaciones significativas tanto para humanos como para animales inferiores.

Varios estudios han demostrado que los NHP están naturalmente infectados con parásitos que son infectantes y patógenos para el hombre (Bruce, 1993; Haiegwa, 1983; Hira et al., 1963; Muchemi, 1992). La transmisión cruzada de patógenos entre humanos y primates ha sido demostrada en diferentes partes de África (Bruce, 1993; Haiegwa, 1983; Hira et al., 1963; Muchemi, 1992). Esta transmisión es más probable a través de los medios ambientales, y ocasionalmente, mediante el contacto directo ya sea en las instalaciones de investigación o con mascotas (Muriuki et al., 1998).

Teniendo en cuenta el potencial zoonótico de los patógenos presentes en los NHP para el hombre, se justificaría un estudio dirigido a parásitos prevalentes de importancia para la salud pública tales como especies del género *Trichuris* ya que ha sido citado por varios autores como el parásito más común en primates de África con un 47,8 % (Muriuki et al., 1998) y 63,5 % (Munene et al., 1998).

Macaca sylvanus, también conocido como macaco de Gibraltar, es una especie de primate de la familia Cercopithecidae que se encuentra actualmente en zonas reducidas de los Montes Atlas del norte de África y en el Peñón de Gibraltar, en el sur de la Península Ibérica. Es el único primate no humano que puede encontrarse actualmente en libertad en Europa. En Gibraltar se considera casi como una mascota no oficial, donde habita en parques y tejados de las casas y es alimentada tanto por las autoridades como los lugareños (Butynski et al., 2013; Wilson y Reeder, 2005).

2. Objetivos del TFG

Los objetivos que pretende cubrir el presente Trabajo fin de Grado son:

1. Llevar a cabo un estudio epidemiológico valorando la presencia de *Trichuris* spp. en primates de diferentes zoológicos de Andalucía, Cantabria y Valencia.
2. Realizar un estudio morfológico y biométrico de los adultos de *Trichuris* spp. aislados, tras necropsia del ciego, y de los huevos aislados de las heces de estos primates.
3. Caracterizar molecularmente los adultos y huevos de *Trichuris* spp.

3. Metodología

3.1. Material

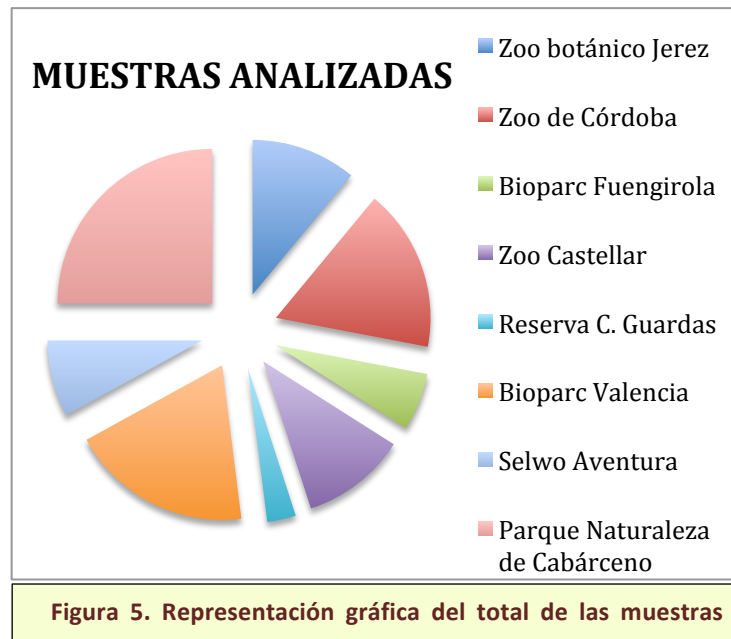
El material objeto de estudio fueron 100 muestras fecales de diferentes primates de zoológicos de Andalucía, Cantabria y Valencia y adultos de *Trichuris* sp. aislados del ciego de *M. sylvanus* procedente del Parque zoológico de Castellar (Castellar de la Frontera, Cádiz) (Tabla 1 y Figura 5)

Tabla 1. Resumen de las muestras fecales estudiadas de los diferentes zoológicos.

HOSPEDADOR	MUESTRAS Nº identificación	ALIMENTACIÓN	MUESTRA I/C	CONVIVENCIA
ZOOBOTÁNICO JEREZ				
<i>Lemur catta</i>	JE1.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Varecia variegata variegata</i>	JE2.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cercocebus torquatus lunulatus</i>	JE3.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Macaca fascicularis</i>	JE4.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Macaca sylvanus</i>	JE5.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Mandrillus sphinx</i>	JE6.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Pan troglodytes</i>	JE7.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cebuella pygmaea</i>	JE8.1	Omnívoro	Colectiva	Convivencia con otros Titi
<i>Leontothecus chrysomelas</i>	JE9.1	Frugívoro	Colectiva	Convivencia con otros Titi
<i>Saguinus imperator subgriseus</i>	JE10.1	Omnívoro	Colectiva	Convivencia con otros Titi
<i>Saguinus oedipus</i>	JE11.1	Omnívoro	Colectiva	Convivencia con otros Titi
ZOO DE CÓRDOBA				
<i>Lemur catta</i>	CO1.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Varecia variegata</i>	CO2.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Eulemur fulvus</i>	CO3.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Macaca sylvanus</i>	CO4.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Macaca sylvanus</i>	CO4.2	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cercocebus atys</i> spp. <i>lunulatus</i>	CO5.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cercocebus atys</i> spp. <i>lunulatus</i>	CO5.2	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i>	CO6.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i>	CO6.2	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i>	CO6.3	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i>	CO6.4	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	CO7.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	CO7.2	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Saimiri</i> sp.	CO8.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Hylobates leucogenys</i>	CO9.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cebuella pygmaea</i>	CO10.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Saimiri</i> sp.	CO11.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie

BIOPARC FUENGIROLA				
<i>Colobus guereza kikuyensis</i>	FU1.1	Vegetariano	Colectiva	<i>Miopithecus ogouensis</i>
<i>Miopithecus ogouensis</i>	FU2.1	Vegetariano	Colectiva	<i>Colobus guereza kikuyensis</i>
<i>Pan troglodytes verus</i>	FU3.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Nomascus gabriellae</i>	FU4.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i>	FU5.1	Omnívoro	Colectiva	<i>Cercopithecus roloway</i>
<i>Cercopithecus roloway</i>	FU6.1	Omnívoro	Colectiva	<i>Gorill gorilla</i>
ZOO DE CASTELLAR				
<i>Macaca sylvanus</i>	CA1.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Macaca sylvanus</i>	CA1.2	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Macaca sylvanus</i>	CA1.3	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Macaca sylvanus</i>	CA1.4	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Saguinus midas</i>	CA2.1	Omnívoro	Colectivo	Aislada la especie
<i>Saguinus oedipus</i>	CA3.1	Omnívoro	Colectivo	Aislada la especie
<i>Cebus capucinus</i>	CA4.1	Omnívoro	Colectivo	Aislada la especie
<i>Papio sp.</i>	CA5.1	Omnívoro	Colectivo	Aislada la especie
<i>Lemur catta</i>	CA6.1	Vegetariano	Colectivo	Aislada la especie
<i>Varecia variegata</i>	CA7.1	Vegetariano	Colectivo	Aislada la especie
<i>Varecia variegata y Lemur catta</i>	CA8.1	Omnívoro y vegetariano	Colectivo	<i>Varecia variegata y Lemur catta</i>
LA RESERVA DEL CASTILLO DE LAS GUARDAS				
<i>Lemur catta</i>	CG1.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Pan troglodytes</i>	CG2.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Macaca sylbanus</i>	CG3.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
BIOPARC VALENCIA				
<i>Cercopithecus neglectus</i>	VA1.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Goril gorilla</i>	VA2.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Cercocebus spp.</i>	VA3.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Goril gorilla (Rabili)</i>	VA4.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Miopithecus ogouensis</i>	VA5.1	Vegetariano	Individual	Aislada la especie
<i>Goril gorilla (Thomas)</i>	VA6.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Goril gorilla (Situ)</i>	VA7.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Eulemur ribriventer</i>	VA8.1	Vegetariano	Individual	Aislada la especie
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	VA9.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Eulemur rubriventer</i>	VA10.1	Vegetariano	Individual	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i>	VA11.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Varecia variegata variegata</i>	VA12.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Miophitecus ogouensis</i>	VA13.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Lemur catta</i>	VA14.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Eulemur rufus</i>	VA15.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Pan troglodytes</i>	VA16.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Miophitecus ogouensis</i>	VA17.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
<i>Miophitecus ogouensis</i>	VA18.1	Vegetariano	Individual	Aislada la especie
<i>Eulemur mongoz</i>	VA19.1	Vegetariano	Colectiva	Aislada la especie
SELWO AVENTURA				
<i>Macaca sylvanus</i>	SA1.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie

<i>Callimico goeldii</i>	SA2.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Chlorocebus aethiops</i>	SA3.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Saguinus imperator</i>	SA4.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Callithrix geoffroyi</i>	SA5.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Hylobates lar</i>	SA6.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Colobus guereza</i>	SA7.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
<i>Colobus guereza</i>	SA8.1	Omnívoro	Colectiva	Aislada la especie
PARQUE DE LA NATURALEZA CABÁRCENO				
<i>Gorill gorilla</i> (Nadia)	CAB1.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Nadia)	CAB1.2	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Nicky)	CAB2.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Nicky)	CAB2.2	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (N'Guvu)	CAB3.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (N'Guvu)	CAB3.2	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Moja)	CAB4.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Moja)	CAB4.2	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Gwet)	CAB5.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Gwet)	CAB5.2	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Chelewa)	CAB6.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Chelewa)	CAB6.2	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Duni)	CAB7.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Gorill gorilla</i> (Duni)	CAB7.2	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i> (Mi Brazza)	CAB8.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i> (Mi Brazza)	CAB9.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i> (Jeta)	CAB10.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i> (Macho viejo)	CAB11.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i> (Carla)	CAB12.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i> (Madre)	CAB13.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Cercopithecus neglectus</i> (Cria)	CAB14.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Macaca sylvanus</i> (Mi Gibraltar)	CAB15.1	Omnívoro	Colectiva	Ciervos, gamos y muflones
<i>Macaca sylvanus</i> (Mi Gibraltar)	CAB16.1	Omnívoro	Colectiva	Ciervos, gamos y muflones
<i>Papio sp.</i> (Papion)	CAB17.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie
<i>Papio sp.</i> (Papion)	CAB18.1	Omnívoro	Individual	Aislada la especie



3.2. Métodos

3.2.1. Estudio epidemiológico

La presencia de elementos parasitarios en muestras fecales depende de diversos factores. Así, se presenta una limitación cuando éstos se encuentran en escaso número, si la eliminación de estos componentes es variable, en función del tiempo y otras razones, como una emisión de heces más o menos diluida, deposición más o menos abundante, etc. Por estas razones, son imprescindibles varios análisis antes de que un resultado negativo pueda ser aceptado como tal (García Martos et al., 1993).

Para la detección de huevos de *Trichuris* spp. en muestras fecales se llevó a cabo, en todas las muestras obtenidas, un Análisis Coprológico Parasitario (A.C.P) utilizando primeramente un método de Examen directo y, posteriormente, una técnica de concentración: el método de Telemann modificado.

Examen directo

1. Colocar en una copa de cristal cónica una porción (de tamaño de un garbanzo) de las heces a examinar.
2. Añadir poco a poco, sobre todo al principio, solución salina fisiológica al 0,9 % e ir deshaciendo las heces en el diluyente con ayuda de una varilla de vidrio, hasta conseguir una suspensión fina y homogénea.
3. Colocar en un portaobjetos limpio una gota de suspensión fecal.
4. Cubrir la gota con un cubre-objetos y observar al microscopio.

Independientemente del resultado del examen directo en fresco, se procede a realizar el examen tras concentración para descartar falsos negativos por diferentes razones como el multiparasitismo o la baja concentración parasitaria en la muestra.

Método de Telemann modificado

1. Tomar, de la dilución fecal realizada para el examen directo en fresco, 2-3 ml y colocarlos en un tubo de centrifuga.
2. Añadir a cada tubo un volumen igual de éter a la suspensión fecal colocada.
3. Centrifugar a 2.000 r.p.m., durante unos 3 minutos.
4. Eliminar el tapón intermedio que se forma en el tubo y verter violentamente el sobrenadante.
5. Resuspender el sedimento (suele ser suficiente el líquido que se desliza por las paredes del tubo tras la eliminación del sobrenadante).
6. Colocar una gota del sedimento entre portaobjetos y cubreobjetos y observar.

3.2.2. Identificación morfológica y estudios biométricos de huevos y adultos de *Trichuris* sp.

Para el estudio biométrico y morfológico se estudiaron en primer lugar huevos de

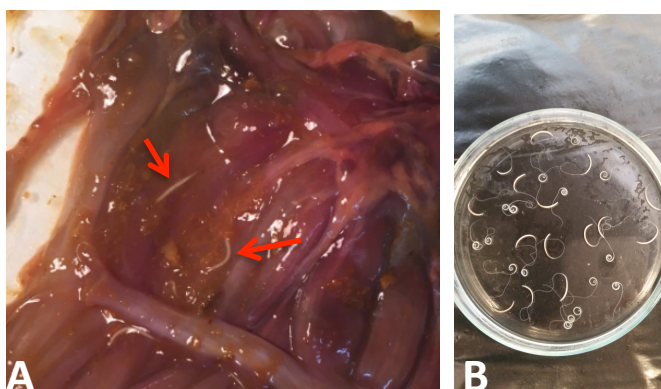


Figura 6. A. Parte del ciego de *Macaca sylvanus* infectado con *Trichuris* sp. (flechas) B. Adultos aislados.

Trichuris spp. presentes en la muestras fecales analizadas y en segundo lugar adultos de *Trichuris* sp. aislados del ciego de *M. sylvanus* del zoológico de Castellar (Castellar de la Frontera, Cádiz) (Figura 6). Para ello, los adultos se lavaron extensivamente en solución salina al 0,9 % para eliminar los restos del hospedador

y se conservaron por separado congelados a -20º C hasta su posterior estudio molecular.

Los estudios biométricos de los huevos de *Trichuris* spp. se basaron en la medición de 50 huevos de cada muestra de primate que dio positivo en el estudio epidemiológico. Este estudio se basó en la medición de los siguientes parámetros: la longitud y la anchura del huevo, y la longitud y anchura de los tapones mucosos.

Asimismo, los estudios biométricos se llevaron a cabo en 30 adultos (15 machos y 15 hembras) de *Trichuris* sp. aislados del ciego del macaco según los parámetros citados por

Špakulová y Lýsek (1981) y Suriano y Navone, (1994). Además, se calcularon los parámetros estadísticos básicos (media y desviación estándar).

3.2.3. Estudios moleculares y filogenéticos

El análisis molecular y filogenético se llevó a cabo tanto en muestras de huevos previamente embrionados como en adultos de *Trichuris* sp. de *M. sylvanus*.

Tras realizar el A.C.P, las muestras fecales que dieron un resultado positivo a *Trichuris* spp., y con el fin de recolectar un mayor número de huevos, se sometieron a la técnica de concentración basada en un método de flotación utilizando una solución saturada de azúcar (Sheather, 1923). La técnica de flotación es usada rutinariamente para el diagnóstico de la mayoría de los parásitos que residen en el tracto gastrointestinal. La gravedad específica y el tipo de solución utilizada influyen en los resultados obtenidos. Una solución saturada de azúcar con una densidad de 1,27 ha demostrado conseguir la flotación de la mayoría de los estados parasitarios con mínima distorsión (Foreyt, 1989).

Técnica de Flotación (Sheather, 1923)

1. Filtrar el volumen fecal con un cedazo para eliminar las impurezas más gruesas a un vaso de precipitado.
2. Rellenar, con el volumen conseguido, 6 tubos de centrífuga y centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos.
3. Desechar el sobrenadante y mantener el sedimento.
4. Traspasar los sobrenadantes de los 6 tubos de centrífuga a un único tubo.
5. Repetir este procedimiento 3 veces más hasta conseguir 4 tubos de centrífuga rellenos de sedimento.
6. A estos 4 tubos, añadir agua destilada hasta la primera línea del tubo y resuspender el sedimento con ayuda de una pipeta.
7. Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos y desechar el sobrenadante de cada tubo y añadir una solución saturada de azúcar (densidad 1,27) hasta la primera línea del tubo.
8. Refrigerar durante 24 horas.
9. Tomar del tercio superior de cada tubo y colocar cada uno de ellos en tubos de centrífuga.
10. Añadir agua destilada en cada tubo de centrífuga hasta la primera línea del tubo y centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos y eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento y unirlos en una misma placa.

Una vez concentrados y aislados los huevos de *Trichuris* spp., se sometieron a incubación con el objetivo de obtener finalmente huevos embrionados para su posterior extracción de ADN. Así, el material obtenido, se cultivó a 32° C durante 3-4 semanas en tubos con solución de dicromato potásico al 0,2 % (Horii y Usui, 1985). Transcurrido este tiempo, se recolectaron manualmente los huevos en lotes de 20, 50 y 200 huevos aproximadamente en tubos Eppendorf y se almacenaron a 4° C para su posterior estudio molecular (Cutillas et al., 2009).

3.2.3.1. Selección de marcadores moleculares

Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que los marcadores del ADNr y los marcadores del ADNmt son los más utilizados en la identificación y taxonomía de los nematodos y, en concreto, en las especies del género *Trichuris*.

En el presente trabajo hemos amplificado y secuenciado 4 regiones del ADN correspondientes a los genes de la citocromo oxidasa 1 (*cox1*) y el gen de la citocromo b (*cytb*) del ADNmt, y el Espaciador Interno Transcrito 2 (ITS2) y el gen 18S del ADNr.

3.2.3.2. Extracción del ADN

Se ha utilizado como material de partida para la extracción, el adulto completo o un concentrado de 20, 50 y 200 huevos recogidos mediante la técnica de concentración por flotación y embrionados durante 3-4 semanas. Posteriormente, los huevos se someten a choque térmico con tres ciclos de nitrógeno líquido, de 30 segundos, alternados con 30 segundos a temperatura ambiente y seguido de tres ciclos de 15 segundos de sonicación.

El ADN genómico de cada adulto y de los paquetes de huevos se prepararon en tubos de Eppendorf individuales siguiendo el protocolo del kit de extracción de ADN *DNeasy® Blood & Tissue Handbook Kit* (QIAGEN), que se basa en tres pasos fundamentales y se realiza utilizando columnas *DNeasy Mini spin*. El procedimiento de extracción se fundamenta en el empleo de una matriz que retiene los productos de la lisis celular y permite la obtención de un extracto de ADN. Este proceso con columnas spin intenta evitar la contaminación cruzada entre muestras distintas.

3.2.3.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Una vez realizada la extracción se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % con la finalidad de verificar el éxito de la extracción. El gel con el ADN se sumerge en una cubeta de electroforesis con tampón (TBE 5X) de pH alrededor de 8. De esta forma, las

moléculas de ácidos nucleicos se desplazarán al polo positivo, ya que a pH superiores a 5, los ácidos nucleicos poseen carga negativa.

La presencia de ADN se corrobora gracias a la adición de SYBR-safe al gel, que se intercala en la cadena de ADN y permite su visualización tras la exposición del gel a la luz UV entre 302-312 nm (Sambrook y Russell, 2001) mediante el uso de un transiluminador.

Los reactivos de electroforesis utilizados son los siguientes:

1. Tampón TBE 5X: Tris, 54g; Ácido Bórico, 27,5g; EDTA, 372g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml.
2. SYBR-safe: 4 µl, conservación a temperatura ambiente.

3.2.3.4. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR consiste en una reacción enzimática que permite la amplificación de fragmentos de ADN de longitud entre 100 y varios miles de pares de bases mediante ciclos de tres reacciones simples que se repiten. Este procedimiento se realiza a distintas temperaturas de incubación. Toda la reacción se produce en el mismo medio y el proceso está completamente automatizado (Mullis y Faloona, 1987; Saiki et al., 1988).

La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Master Cycler ep gradient, donde se programaron los pasos siguientes:

1. Desnaturalización
2. Hibridación
3. Elongación

En este trabajo, como hemos mencionado anteriormente, se llevó a cabo la amplificación de los marcadores moleculares ITS2 y 18S del ADNr y *cox1* y *cytb* del ADNmt de las diferentes muestras de *Trichuris* aisladas. La técnica se llevó a cabo a distintas concentraciones de los reactivos hasta llegar a las condiciones óptimas de reacción.

Los reactivos utilizados de PCR fueron los mismos para todos los marcadores (Tabla 2).

En cada proceso se incluye un control positivo (con ADN conocido) y un control negativo (sin ADN) para detectar posibles contaminaciones.

Tabla 2. Cuadro resumen de reactivos utilizados en la PCR.

Mezcla de reactivos				
	ITS2	18S	<i>cox1</i>	<i>cytb</i>
Cebador directo (10µM)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Cebador reverso (10µM)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
ADN diana	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<i>Gotaq</i> G2 Green Mater Mix (Promega)	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
H ₂ O bidestilada c.s.p.	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Cebadores				
Directo	5,8SF (Robles et al., 2014)	G18S4 (Callejón et al., 2013)	HCO2198F (Callejón et al., 2013)	769 (Liu et al., 2012)
Reverso	ITS2R (Ellis y Horvitz, 1986)	647 (Callejón et al., 2013)	CORA (Callejón et al., 2013)	770 (Liu et al., 2012)
Ciclos de PCR				
Desnaturalización inicial	94° C – 3'	94° C – 4'	94° C – 5'	94° C – 5'
Número de ciclos	35	34	40	36
Desnaturalización	94° C – 1'	94° C – 30'	94° C – 1'	94° C – 30''
Hibridación	50° C – 1'	60° C – 30'	48° C – 1'	50° C – 30''
Elongación	72° C – 1'	72° C – 1'20'	72° C – 1'	72° C – 30'
Elongación final	72° C – 10'	72° C – 7'	72° C – 7'	72° C – 5'

- Amplificación parcial del Espaciador Interno Transcrito 2 (ITS2): Los cebadores han sido (Robles et al., 2014):

Cebador directo: 5,8SF: 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3'

Cebador reverso: ITS2R: 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'

- Amplificación parcial del gen 18S: Los cebadores han sido (Callejón et al., 2013):

Cebador directo: G18S4: 5'-GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC-3'

Cebador reverso: 647: 5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTCGC-3'

- Amplificación parcial del gen citocromo c oxidasa 1 (*cox1*): Los cebadores han sido (Callejón et al., 2013):

Cebador directo: HCO2198F: 5'-TGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA-3'

Cebador reverso: CORA: 5'-ACYACATAGTAGGTRTCATG-3'

- Amplificación parcial del gen citocromo b (*cytb*) (Liu et al., 2012):

Cebador directo: 769: 5'-GAGTAATTTTATAATRCGRGAAGT-3'

Cebador reverso: 770: 5'-AATTTTCAGGRTCTCTCTTCAATA-3'

Una vez finalizada la reacción de PCR, las muestras son sometidas a una electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón TBE a voltaje constante, en presencia de SYBR-safe y utilizando un marcador de pesos moleculares. Posteriormente, se observa el gel en un transiluminador, donde pueden visualizarse la banda correspondiente al fragmento de ADN estudiado. Finalmente, se fotografía con el sistema KODAK 1D.

3.2.3.5. Purificación y cuantificación del ADN amplificado

La purificación del ADN amplificado tiene por finalidad eliminar los componentes de la reacción de PCR (enzimas, desoxinucleótidos trifosfatos, cebadores, ADN, tampón) que pueden interferir en procesos posteriores.

Para la purificación de nuestro producto de PCR se ha utilizado el kit de Promega, QWizard SV Gel and PCR Clean-Up System, permitiéndonos extraer y purificar el ADN a partir del gel de agarosa o del producto de PCR directamente. Una vez purificado, es necesario realizar una cuantificación aproximada, realizada a través de la comparación de la intensidad de la banda del ADN purificado con la de un marcador de tamaño y concentración conocidos.

3.2.3.6. Secuenciación

El ADN contenido en un Eppendorf se concentra en una centrífuga de vacío hasta un volumen final de 30 µl. La muestra es mandada a secuenciar al servicio de secuenciación Stab Vida (Portugal).

3.2.3.7. Análisis de las secuencias

El alineamiento y los análisis de las secuencias se llevaron a cabo utilizando el programa Clustal W 1.83 (Thompson et al., 1994) y MEGA versión 5.3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2011). Estos programas permitieron determinar sus longitudes en pares de bases y composición en bases nucleotídicas así como el porcentaje de similitud intra-específica e inter-específica comparando las secuencias obtenidas en el presente trabajo, así como entre secuencias obtenidas de bases de datos de ADN (GenBank).

3.2.3.8. Análisis filogenético

Partiendo de los alineamientos de las diferentes matrices de datos se seleccionaron los modelos evolutivos más adecuados al paquete de secuencias mediante el programa jModeltest versión 2.1.7, llevándose a cabo la selección del modelo mediante el hierarchical likelihood ratio test (hLRTs). A partir de los resultados obtenidos se elaboraron los árboles filogenéticos usando el método de Máxima verosimilitud (ML, Maximum Likelihood). Este método es probabilístico, evalúa una hipótesis filogenética en términos de la probabilidad de que un concreto modelo evolutivo planteado haya dado lugar o explique los datos observados (secuencias nucleotídicas) (Huelsenbeck y Rannala, 1997). Para llevar a cabo este estudio se usó el programa PHYML package (Guindon y Gascuel, 2003). Como taxón de referencia externa (OUTGROUP) se emplearon secuencias del género *Trichinella* obtenidas en GenBank.

Como métodos para la obtención de los soportes estadísticos de los árboles filogenéticos se realizó un muestreo repetitivo de 1000 réplicas (bootstrap). El bootstrap test es un procedimiento utilizado para evaluar la fiabilidad de un árbol filogenético (Felsenstein, 1985).

4. Resultados y discusión

4.1. Resultados epidemiológicos

El A.C.P. de las muestras fecales recogidas de primates de diferentes zoológicos de Andalucía, Valencia y Cantabria (Tabla 1) mostró un porcentaje de prevalencia del 7 % que corresponde a 7 muestras positivas a *Trichuris* de las 100 muestras analizadas (Figuras 7 y 8, Tabla 3). Solo tres tipos de hospedadores dieron positivo de todos los que se han estudiado, aunque una misma especie hospedadora (*C. g. kikuyensis*) ha dado positivo en dos zoológicos diferentes.

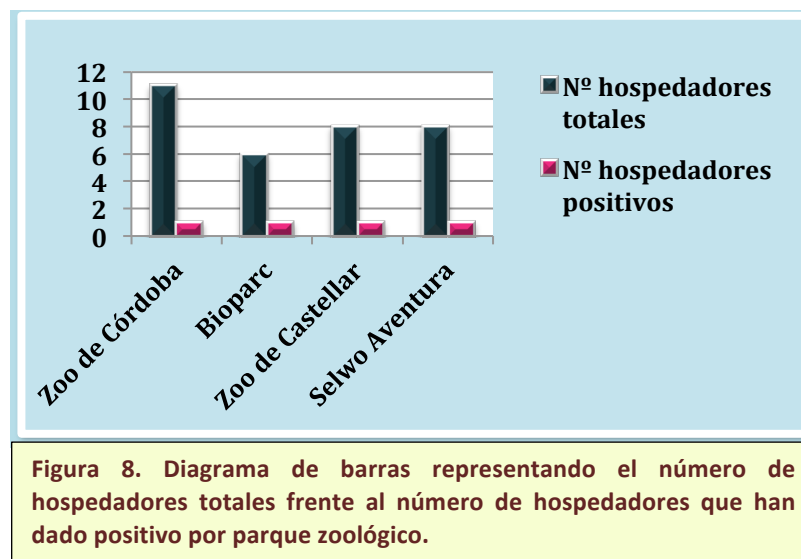
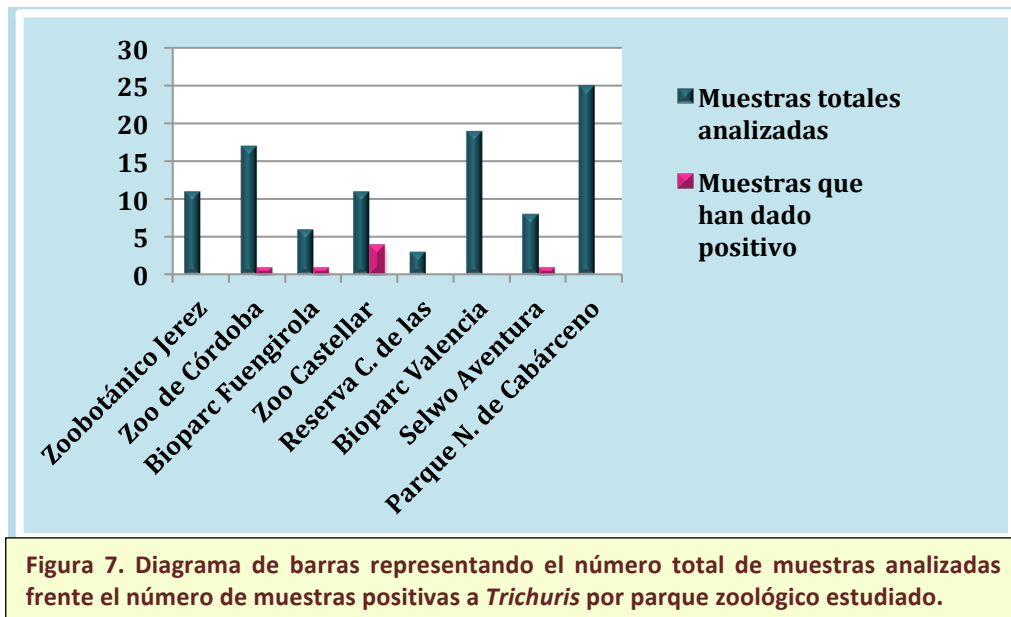


Tabla 3. Muestras recogidas de primates que han dado positivo en *Trichuris* y sus correspondientes zoológicos.

Zoológicos	Hospedadores
Zoo de Córdoba (Córdoba)	<i>Cercopithecus neglectus</i>
Bioparc de Fuengirola (Fuengirola)	<i>Colobus guereza kikuyensis</i>
Zoo de Castellar (Castellar de la Frontera)	<i>Macaca sylvanus</i>
Selwo aventura (Estepona)	<i>Colobus guereza kikuyensis</i>

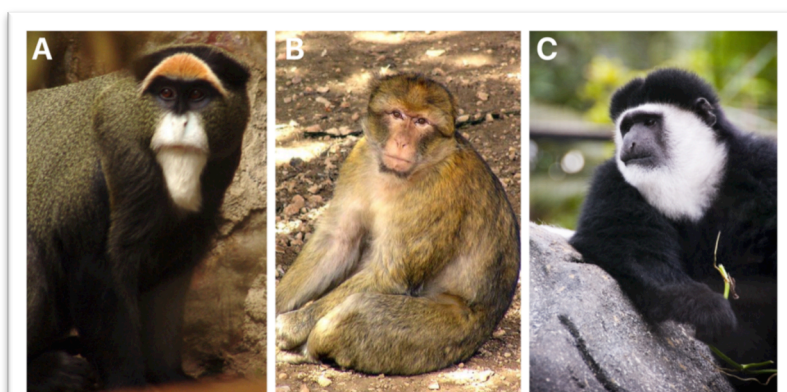


Figura 9. A. *Cercopithecus neglectus*. B. *Macaca sylvanus*. C. *Colobus guereza kikuyensis*.

Las especies de NHP que dieron positivo a *Trichuris* fueron *C. neglectus* (mono de Brazza, Zoo de Córdoba), *M. sylvanus* (macaco de Gibraltar, Zoo de Castellar) y *C. g. kikuyensis* (colobo) procedente de dos parques zoológicos (Bioparc

de Fuengirola y Selwo aventura) (Figura 9. A-C)

En otros estudios, la prevalencia del parasitismo de especies del género *Trichuris* en NHP es mayor, por ejemplo, en primates en África, el parasitismo por *Trichuris* sp. es el más común, con un 47,8 % (Muriuki et al., 1998) y un 63,5 % (Munene et al., 1998). Estos resultados no se asemejan a los estudiados (7 % de prevalencia). Esto puede ser debido a diversos factores, como que en los estudios anteriores la mayoría de los NHP viven en libertad, en cambio, los estudiados en este trabajo viven en cautividad y reciben un tratamiento antihelmíntico periódicamente. Por esta razón, no podrían compararse los resultados epidemiológicos.

4.2. Resultados morfológicos y biométricos

4.2.1. Identificación morfológica de adultos del género *Trichuris* de *M. sylvanus* (Zoo de Castellar)

La identificación morfológica de los adultos de *Trichuris* sp. se ha llevado a cabo mediante microscopía óptica. Los caracteres más relevantes encontrados en los adultos machos (Figura 10) fueron la espícula con pequeñas espinas en forma de triángulos y, en la

mayoría de ellos, apareciendo invaginada. Los caracteres más relevantes en los adultos hembra (Figura 11) fueron la vulva poco prominente y una vagina con pocas circunvoluciones.

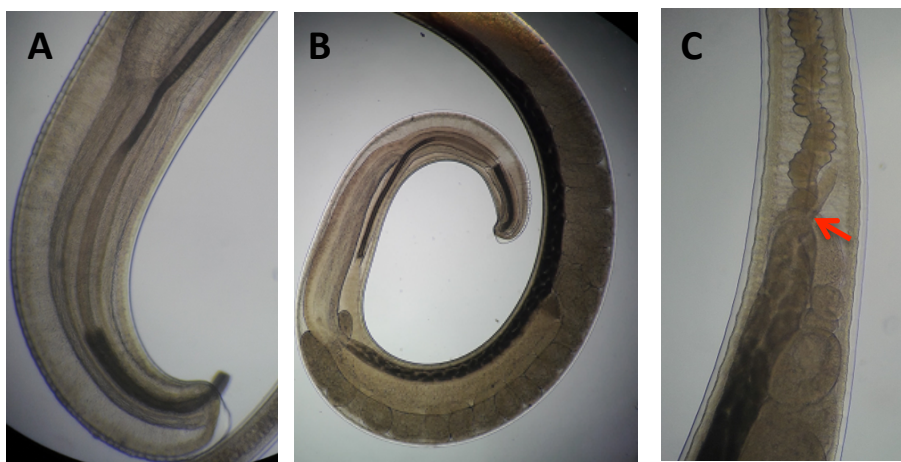


Figura 10. Partes de un adulto macho de *Trichuris* sp. A. Parte posterior del adulto con la vaina espicular sobresalida. B. Parte posterior del adulto con la vaina espicular invaginada. C. Unión del esófago con el intestino (flecha).

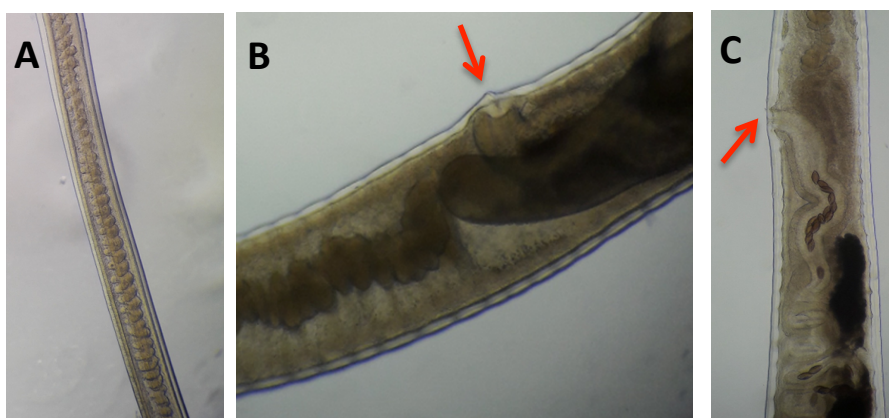


Figura 11. Partes de un adulto hembra de *Trichuris* sp. A. Parte glandular del esófago del adulto (esticocitos). B. Unión del esófago con el intestino y vulva (flecha). C. Vulva (flecha) y vagina.

4.2.2. Identificación morfológica de huevos del género *Trichuris*

La identificación morfológica de los huevos de las distintas especies de *Trichuris* ha sido realizada mediante microscopía óptica. Hemos observado que los huevos de *C. g. kikuyensis* son más achatados, con los tapones mucosos menos sobresalientes que los demás (Figura 11 A). Por otra parte, los huevos de *Trichuris* del macaco se presentaron con dos aspectos: unos más alargados con los tapones mucosos de longitud más corta semejantes a aquéllos de *T. colobae* (Figura 8 B) y otros más pequeños con los tapones mucosos más largos (Figura 8 C). Los huevos del mono de Brazza fueron semejantes a estos últimos (Figura 8 D).

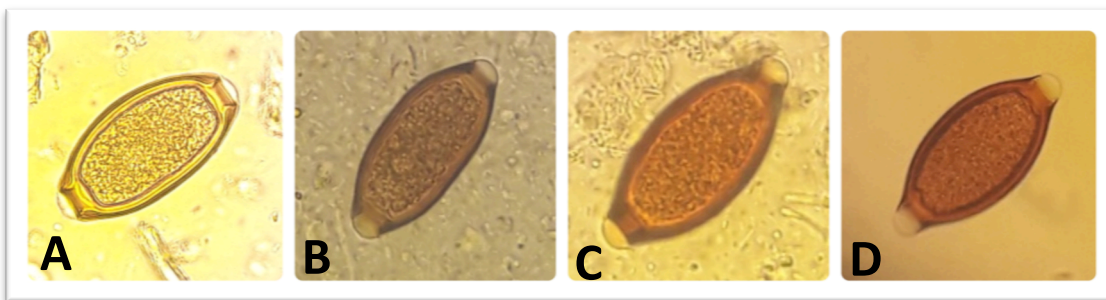


Figura 12. Huevos de las diferentes especies del género *Trichuris* estudiadas. (A) Huevo de *Trichuris* sp. de *Colobus guereza kikuyensis*. (B y C) Huevo de *Trichuris* sp. de *Macaca sylvanus*. (D) Huevo de *Trichuris* sp. de *Cercopithecus neglectus*.

4.2.3. Estudio biométrico de adultos del género *Trichuris* de *M. sylvanus* (Zoo de Castellar)

El estudio biométrico de adultos, se ha llevado a cabo en 15 adultos machos y 15 adultos hembras de *Trichuris* sp. de *M. sylvanus* procedente del Parque Zoológico de Castellar (Tablas 4 y 5).

La longitud total se encontró semejante a la obtenida para *T. colobae*, *T. ursinus* y *T. trichiura*, siendo estas tres especies más pequeñas que *T. suis*. Los parámetros más representativos que podemos destacar en machos del género *Trichuris* es la longitud de la espícula y de la vaina espicular, apareciendo ambos valores mayores en *Trichuris* sp. de *M. sylvanus* que en los machos de *T. colobae*, *T. ursinus* y *T. suis* (Tabla 4).

Las hembras de *Trichuris* sp. aisladas de *M. sylvanus* se presentaron con una longitud total semejante a la de las hembras de *T. trichiura* y más baja que la observada en *T. colobae*, *T. ursinus* y *T. suis* (Tabla 5). Por otra parte, la longitud del esófago fue similar a la observada en *T. trichiura* y considerablemente más pequeña que la observada en *T. colobae* y *T. suis*.

Tabla 4. Resumen de las medidas de 15 parámetros en 15 machos del género *Trichuris*.

	<i>Trichuris</i> sp. de <i>M. sylvanus</i> (presente trabajo)			<i>T. suis</i> de <i>S.s. domestica</i> (Cutillas et al., 2009)			<i>T. trichiura</i> de <i>P. troglodytes</i> (Cutillas et al., 2009)			<i>T. colobae</i> de <i>C. g. kikuyensis</i> (Cutillas et al., 2014)			<i>T. ursinus</i> n. sp. de <i>P. ursinus</i> (Callejón et al., 2017)		
	MIN	MAX	\bar{x}	MIN	MAX	\bar{x}	MIN	MAX	\bar{x}	MIN	MAX	\bar{x}	MIN	MAX	\bar{x}
M1	30	39	34 ± 2	35	50	40 ± 4	32	36	33 ± 2	27	41	35 ± 3	32	41	36 ± 3
M2	19	28	22 ± 3	23	33	26 ± 3	18	23	21 ± 2	21	35	26 ± 4	21	27	24 ± 2
M3	0,12	0,18	0,14 ± 0,02	0,16	0,23	0,20 ± 0,02	0,09	0,31	0,15 ± 0,02	0,07	0,10	0,08 ± 0,01	0,15	0,19	0,17 ± 0,01
M4	0,49	0,74	0,61 ± 0,07	0,76	0,94	0,87 ± 0,06	0,39	0,60	0,50 ± 0,08	0,23	0,52	0,40 ± 0,01	0,53	0,75	0,62 ± 0,07
M5	0,25	0,49	0,37 ± 0,06	0,28	0,40	0,35 ± 0,04	0,15	0,24	0,2 ± 0,04	0,13	0,26	0,20 ± 0,04	0,32	0,46	0,38 ± 0,03
M6	0,33	0,65	0,50 ± 0,09	0,50	0,88	0,66 ± 0,12	-	-	-	0,60	1,80	0,99 ± 0,40	0,30	0,64	0,43 ± 0,09
M7	1,10	1,57	1,33 ± 0,14	1,00	1,76	1,43 ± 0,27	-	-	-	2,33	3,95	3,36 ± 0,43	1,14	2,29	1,67 ± 0,32
M8	2,23	3,24	2,65 ± 0,23	2,05	2,57	2,35 ± 0,15	1,61	2,22	1,9 ± 0,23	1,48	2,17	1,64 ± 0,17	1,88	2,29	2,10 ± 0,11
M9	0,53	1,23	0,93 ± 0,20	0,16	0,76	0,34 ± 0,20	0,22	0,22	0,22	0,26	0,65	0,49 ± 0,09	0,23	0,69	0,54 ± 0,14
M10	0,04	0,08	0,06 ± 0,01	0,04	0,10	0,05 ± 0,02	0,01	0,06	0,02 ± 0,02	0,02	0,05	0,04 ± 0,01	0,06	0,12	0,08 ± 0,02
M11	0,04	0,08	0,06 ± 0,01	0,06	0,08	0,07 ± 0,01	0,05	0,09	0,07 ± 0,02	0,03	0,06	0,04 ± 0,01	0,05	0,07	0,06 ± 0,01
M12	0,06	0,09	0,07 ± 0,01	0,06	0,23	0,13 ± 0,06	0,09	0,11	0,09 ± 0,01	0,04	0,12	0,05 ± 0,02	0,06	0,09	0,07 ± 0,01
M13	2,90	5,19	4,06 ± 0,58	3,42	4,92	4,31 ± 0,56	1,79	1,95	1,88 ± 0,07	2,55	3,06	2,88 ± 0,07	2,77	3,79	3,18 ± 0,27
M14	1,32	2,34	1,97 ± 0,29	1,33	2,05	1,67 ± 0,19	1,07	-	-	1,35	1,41	1,38 ± 0,03	1,23	1,47	1,34 ± 0,10
M15	1,55	2,75	2,20 ± 0,37	1,44	1,95	1,68 ± 0,17	1,10	-	-	1,32	1,51	1,4 ± 0,10	1,61	1,89	1,75 ± 0,09

Mediciones realizadas: M1: Longitud del cuerpo del adulto, M2: Longitud de la región esofágica del cuerpo, M3: Anchura de la región esofágica del cuerpo, M4: Máxima anchura de la región posterior del cuerpo, M5: Anchura del cuerpo en el lugar de unión del esófago con el intestino, M6: Distancia desde la cabeza hasta el comienzo de las bandas bacilares, M7: Longitud de las bandas bacilares, M8: Longitud de la espícula, M9: Máxima longitud de la vaina espicular, M10: Anchura de la parte final de la espícula, M11: Anchura de la vaina espicular en la parte final del cuerpo, M12: Máxima anchura de la vaina espicular, M13: Distancia entre la parte posterior de los testículos y el final del cuerpo, M14: Distancia del tubo proximal, M15: Distancia del tubo distal. Las medidas están expresadas en milímetros (mm).

Tabla 5. Resumen de las medidas de 13 parámetros en 15 hembras del género *Trichuris*.

	<i>Trichuris</i> sp. de <i>M. sylvanus</i> (presente trabajo)			<i>T. suis</i> de <i>Sus scrofa domestica</i> (Cutillas et al., 2009)			<i>T. trichiura</i> de <i>Pan troglodytes</i> (Cutillas et al., 2009)			<i>T. colobae</i> de <i>C. g. kikuyensis</i> (Cutillas et al., 2014)			<i>T. ursinus</i> n. Sp. de <i>P. ursinus</i> (Callejón et al., 2017)		
	MIN	MAX	\bar{x}	MIN	MAX	\bar{x}	MIN	MAX	\bar{x}	MIN	MAX	\bar{x}	MIN	MAX	\bar{x}
F1	30	38	34 ± 2	41	50	44 ± 3	20	42	33 ± 8	41	52	46 ± 4	30	49	38 ± 6
F2	18	26	22 ± 2	30	35	31 ± 2	13	33	25 ± 7	30	38	34 ± 3	20	37	26 ± 5
F3	0,13	0,18	0,15 ± 0,01	0,18	0,21	0,19 ± 0,01	0,09	0,19	0,14 ± 0,04	0,08	0,15	0,11 ± 0,02	0,15	0,19	0,17 ± 0,02
F4	0,65	0,82	0,72 ± 0,05	0,84	1,05	0,93 ± 0,10	0,38	0,64	0,45 ± 0,08	0,46	0,77	0,60 ± 0,09	0,54	0,89	0,68 ± 0,08
F5	0,36	0,48	0,42 ± 0,03	0,30	0,40	0,36 ± 0,03	0,13	0,23	0,17 ± 0,03	0,16	0,31	0,23 ± 0,04	0,35	0,45	0,40 ± 0,02
F6	0,42	0,76	0,50 ± 0,09	0,44	0,71	0,58 ± 0,09	0,48	0,64	0,56 ± 0,11	0,50	1,03	0,79 ± 0,04	0,42	0,62	0,52 ± 0,07
F7	0,90	1,71	1,44 ± 0,21	1,20	1,66	1,46 ± 0,16	0,36	0,63	0,50 ± 0,19	2,90	4,92	3,45 ± 0,70	1,29	2,00	1,70 ± 0,23
F8	0,73	1,99	1,12 ± 0,35	0,96	1,46	1,26 ± 0,17	0,68	1,29	0,96 ± 0,20	0,95	1,65	1,29 ± 0,28	1,88	2,81	2,26 ± 0,33
F9	0,02	0,09	0,05 ± 0,02	0,04	0,09	0,07 ± 0,02	0,03	0,05	0,04 ± 0,01	0,04	0,08	0,06 ± 0,02	0,06	0,12	0,08 ± 0,02
F10	0,15	0,33	0,25 ± 0,08	0,09	0,29	0,23 ± 0,08	0,11	0,24	0,15 ± 0,05	0,21	0,39	0,29 ± 0,05	0,03	0,38	0,18 ± 0,10
F11	0,40	0,84	0,62 ± 0,14	0,11	0,77	0,41 ± 0,23	0,13	0,24	0,21 ± 0,04	0,20	0,45	0,34 ± 0,11	0,10	0,75	0,47 ± 0,22
F12	0,19	0,48	0,30 ± 0,10	0,42	0,91	0,61 ± 0,19	0,32	0,53	0,44 ± 0,11	0,93	1,90	1,49 ± 0,29	0,50	1,71	1,04 ± 0,35
,	0,05	0,14	0,11 ± 0,04	1,04	1,31	1,19 ± 0,12	0,66	0,67	0,67 ± 0,07	0,50	1,20	0,84 ± 0,23	0,77	1,32	0,99 ± 0,20

Mediciones realizadas: F1: Longitud del cuerpo del adulto, F2: Longitud de la región esofágica del cuerpo, F3: Anchura de la región esofágica del cuerpo, F4: Máxima anchura de la región posterior del cuerpo, F5: Anchura del cuerpo en el lugar de unión del esófago con el intestino, F6: Distancia desde la cabeza hasta el comienzo de las bandas bacilares, F7: Longitud de las bandas bacilares, F8: Longitud de la vagina, F9: Diámetro de la vulva cuando sale al exterior del cuerpo, F10: Distancia desde la vulva hasta el lugar de unión del esófago con el intestino, F11: Distancia desde la parte posterior del útero hasta el final del cuerpo, F12: Distancia desde el final del cuerpo hasta el extremo posterior del receptáculo seminal, F13: Anchura de la zona muscular del esófago. Las medidas están expresadas en milímetros (mm).

4.2.4. Estudio biométrico de huevos del género *Trichuris* de *M. sylvanus* (Zoo de Castellar)

Tabla 6. Resumen de la medida de los huevos de *Trichuris* spp. estudiados (expresados en micrómetros).

	<i>Cercopithecus neglectus</i> (Zoo de Córdoba)			<i>Macaca sylvanus</i> (Zoo de Castellar)			<i>Colobus guereza kikuyensis</i> (Bioparc Fuengirola)			<i>Colobus guereza kikuyensis</i> (Selwo Aventura)		
	MIN	MAX	\bar{X}	MIN	MAX	\bar{X}	MIN	MAX	\bar{X}	MIN	MAX	\bar{X}
Longitud del huevo (μm)	61,1	68,2	65,3 \pm 1,8	49,4	68,2	56,1 \pm 3,0	51,7	75,8	68,8 \pm 4,2	47,0	58,8	54,3 \pm 4,6
Anchura del huevo (μm)	28,2	35,3	29,8 \pm 1,7	23,3	32,9	26,8 \pm 2,4	30,6	44,7	37,9 \pm 4,0	23,5	28,2	25,8 \pm 1,5
Longitud del tapón (μm)	7,1	11,8	9,7 \pm 1,2	7,1	9,4	8,2 \pm 1,2	7,1	14,1	8,9 \pm 1,4	7,1	9,4	7,4 \pm 1,0
Anchura del tapón (μm)	7,1	9,4	7,6 \pm 1,1	7,1	9,4	7,7 \pm 1,1	7,1	11,8	9,3 \pm 1,4	7,1	9,4	8,1 \pm 1,3

El análisis comparativo de las medidas de los huevos aislados de las diferentes especies de primates mostró algunas diferencias. Las medidas de los huevos de *Trichuris* sp. de *C. g. kikuyensis* de Selwo Aventura no son significativos al obtener solo una muestra de 6 huevos, en cambio, para las demás medidas se analizaron muestras de 50 huevos de cada hospedador.

Analizando estos resultados observamos que los huevos de *Trichuris* sp. de *M. sylvanus* son más pequeños en cuanto a longitud (\bar{X} = 56,1 \pm 3 μm) que los huevos de *Trichuris* sp. de *C. neglectus* y los de *C. g. kikuyensis*. Este último es el que tiene una desviación mayor, y esto puede ser debido a que en este primate coexistan dos tipos diferentes de huevos de *Trichuris*. Este hecho parece estar también presente en *Trichuris* sp. de macaco de Gibraltar, ya que se observaron algunos huevos más cortos y anchos y otros más largos y estrechos (Figura 12 B y C).

Comparando los resultados de la anchura del tapón del huevo, podemos resaltar también que los huevos de *Trichuris* sp. presentes en *C. g. kikuyensis*, al igual que la longitud, es superior al de las otras dos especies estudiadas.

Estudios similares han sido llevados a cabo por otros autores quienes analizaron la variación del tamaño de los huevos de *T. trichiura* procedentes del hombre (Yoshikawa et al., 1989). Estos autores encontraron dos medidas para los huevos de *T. trichiura*, el 80 % de los huevos presentaron la variedad más pequeña (57 x 26 μm) mientras que el 20 % mostraron la variedad más grande (78 x 30 μm). Un estudio similar fue llevado a cabo por Horii y Usui (1985) quienes estudiaron biométricamente huevos de *Trichuris* aislados del hombre y de *Macaca fuscata* procedente de Japón. Así, los huevos de *Trichuris* aislados del hombre mostraron una medida de 57,5-65 x 23,8-27,5 μm y los huevos de *Trichuris* sp. aislados de *M. fuscata* mostraron unas medidas de 42,5-57,5 x 25-32 μm . Atendiendo a estos resultados,

estos autores concluyeron que muchos monos salvajes que viven en Japón están infectados con un alto número de *T. trichiura*.

Estos resultados parecen sugerir la existencia de una similitud biométrica entre los huevos de *Trichuris* procedentes de *M. sylvanus* con los de *T. trichiura* presentes en el hombre.

4.3. Resultados moleculares

Se han realizado diferentes amplificaciones de los marcadores moleculares *cox1*, *cytb*, 18S e ITS2 en adultos y huevos aislados de un *M. sylvanus* procedente del Centro de Rescate Animal, Zoo de Castellar. A continuación, se analizaron las secuencias de los diferentes marcadores moleculares. Se han estudiado todos los marcadores mitocondriales (*cox1* y *cytb*) y los ribosómicos (18S e ITS2) por separado y se han realizado los árboles filogenéticos individualmente (no mostrados), obteniendo en los cuatro árboles filogenéticos dos clados bien diferenciados (excluyendo el grupo externo). En el primero, aparecen agrupadas las secuencias de *T. suis*, *T. colobae* y *T. ursinus*, y en el segundo clado, se puede ver como las secuencias de *Trichuris* sp. del macaco se agrupaban con las secuencias de *T. trichiura* y *Trichuris* sp. de diferentes especies de NHP. Con estas secuencias se realizaron dos árboles filogenéticos concatenados con los marcadores *cox1* y *cytb* y otro con los marcadores *cox1*, *cytb* (ADNmt), 18S e ITS2 (ADNr).

4.3.1. Estudio filogenético basado en la concatenación de los marcadores mitocondriales (*cox1* y *cytb*)

La amplificación de los marcadores *cox1* y *cytb*, dieron como resultado una banda, de aproximadamente 400 y 450 pares de bases, respectivamente, correspondientes al producto de PCR.

A continuación, y utilizando diferentes secuencias adicionales adquiridas de GenBank, se llevó a cabo el estudio filogenético, usando como taxones de referencia externa *Trichinella spiralis* y *Trichinella britovi*.

Las secuencias fueron analizadas y alineadas mediante los programas Clustal W 1.83 y Mega 5.3, con cuatro muestras de adultos y una de huevos, adquiriendo un total de 405 pares de bases para el gen *cox1* y 544 pares de bases para el gen *cytb*, obteniendo así una matriz conjunta con un alineamiento de un total de 852 pares de bases, para los que se utilizaron 23 secuencias diferentes de GenBank (incluyendo las secuencias del grupo externo). El marcador mitocondrial *cox1* presenta un contenido de G+C de 38,3-38,8 y el *cytb* un contenido de G+C de 30,3-31,3.

A partir del alineamiento y por medio del programa jModelTest versión 2.1.7, se buscó el modelo más adecuado para construir los árboles filogenéticos. El modelo seleccionado fue, para ambos marcadores, el modelo GTR+I+G (Generalised Time-Reversible). La matriz basada en el gen parcial *cox1* obtuvo un valor de Gamma (G) de 0,7830 y un valor de I de 0,0280, y la matriz basada en el gen parcial *cytb*, un valor de Gamma (G) de 1,506 y un valor de I de 0,4010. A partir de este modelo se construyó el árbol filogenético concatenado (Figura 13).

La topología del árbol filogenético fue construida en base al método de Maximum Likelihood (ML).

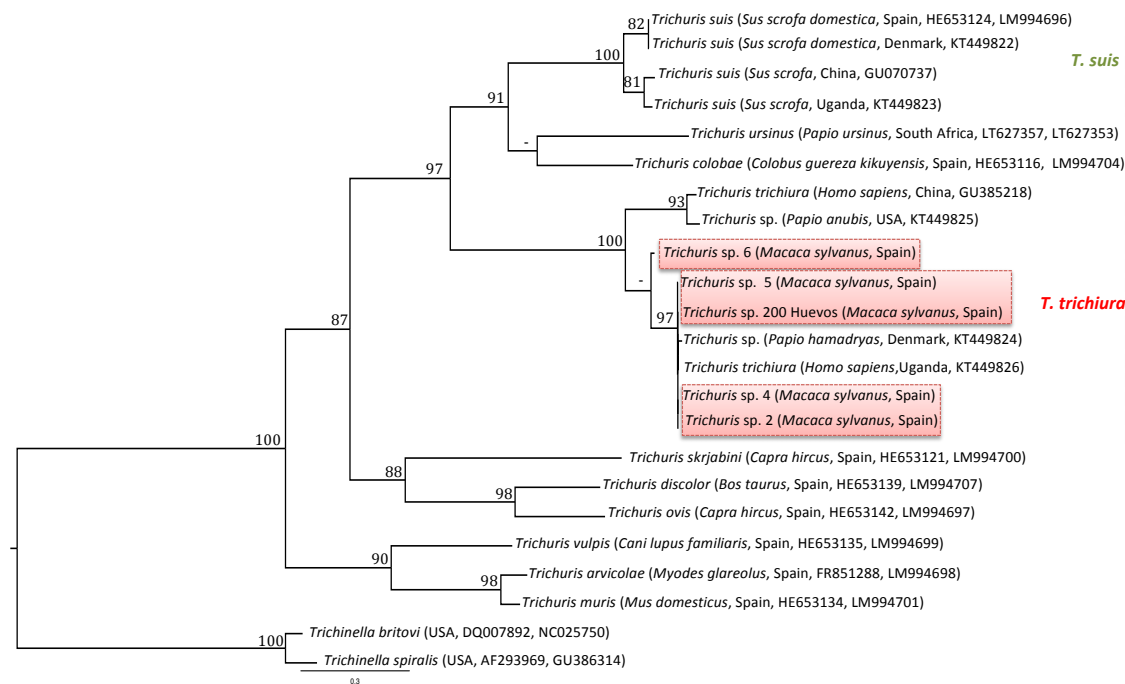


Figura 13. Árbol filogenético concatenado de las secuencias mitocondriales *cox1* y *cytb*. El árbol fue realizado usando el método de Maximum Likelihood (ML). Se muestra el porcentaje de réplicas de árboles en los cuales los taxa se asocian juntos en el mismo clúster en el bootstrap (1000 réplicas). No son mostrados los valores de bootstrap menores al 65 %.

4.3.2. Estudio filogenético basado en la concatenación de los marcadores mitocondriales (*cox1* y *cytb*) y ribosómicos (18S e ITS2)

Además de los resultados nombrados anteriormente, la amplificación de los marcadores 18S e ITS2, dieron como resultado una banda, con aproximadamente 600-700 pares de bases correspondientes al producto de PCR.

A continuación, y utilizando diferentes secuencias adicionales adquiridas de GenBank, se llevó a cabo el estudio filogenético.

Las secuencias fueron analizadas y alineadas mediante los programas Clustal W 1.83 y Mega 5.3, con tres muestras de adultos y una de huevos, adquiriendo un total de 481 pares de bases para el marcador 18S y 930 pares de bases para el marcador ITS2, además de los marcadores *cox1* y *cytb* nombrados en el apartado anterior, obteniendo así una matriz conjunta con un alineamiento con un total de 1321 pares de bases, para los que se utilizaron 12 secuencias diferentes de GenBank, sin utilizar las secuencias del grupo externo, ya que el marcador ITS2 posee secuencias muy variables y no permite un alineamiento fiable o correcto. El marcador ribosómico 18S presenta un contenido de G+C de 50,2 y el ITS2, un contenido de G+C de 65,7-65,9.

A partir del alineamiento y por medio del programa jModelTest versión 2.1.7, se buscó el modelo más adecuado para construir los árboles filogenéticos. El modelo seleccionado fue el modelo GTR+G (Generalised Time-Reversible). El modelo evolutivo para la matriz basada en el gen parcial 18S mostró un valor de G de 43,35, y el ITS2 un valor de G de 2,610. A partir de este modelo se construyó el árbol filogenético concatenado.

La topología del árbol filogenético fue construida en base al método de Maximum Likelihood (ML).

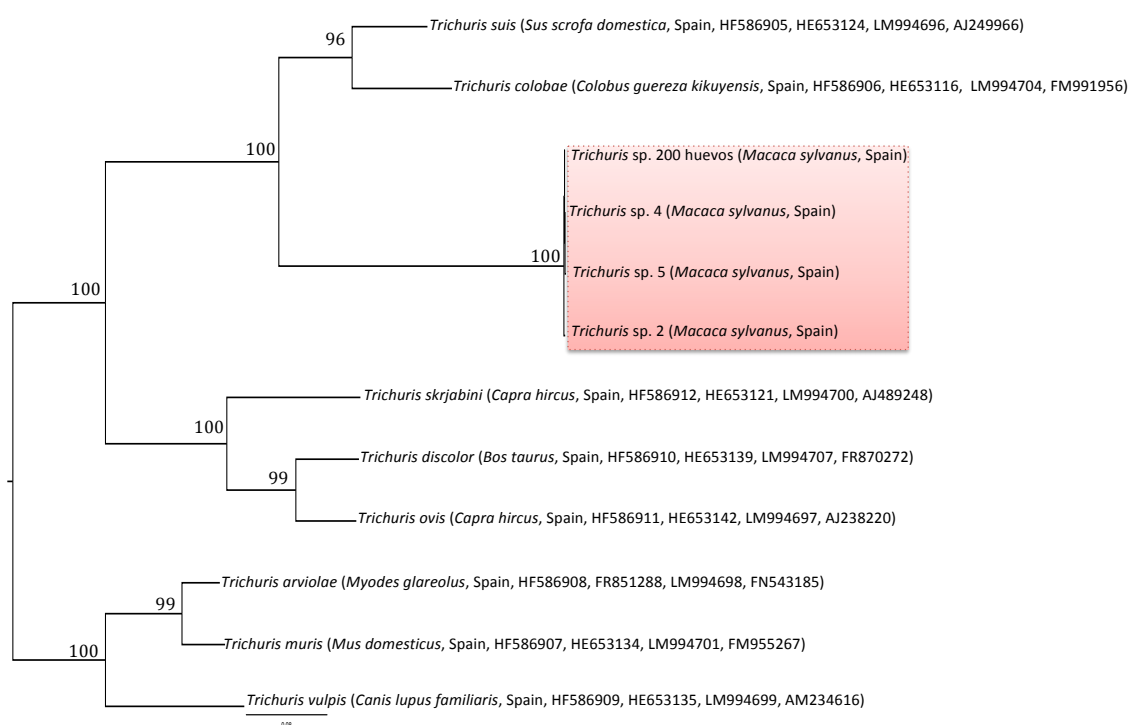


Figura 14. Árbol filogenético concatenado de las secuencias mitocondriales (*cox1* y *cytb*) y ribosómicas (18S e ITS2). El árbol fue realizado usando el método de Maximum Likelihood (ML). Se muestra el porcentaje de réplicas de árboles en los cuales los taxa se asocian juntos en el mismo clúster en el bootstrap (1000 réplicas). No son mostrados los valores de bootstrap menores de 65%.

En todos los árboles filogenéticos estudiados, tanto individualmente (no mostrados) como en el concatenado de los marcadores mitocondriales, las muestras estudiadas en el presente trabajo (*Trichuris* de *M. sylvanus* del Zoo de Castellar) quedaron incluidas, en su totalidad, en el clado de *T. trichiura* y separado pero relacionado con el clado compuesto por secuencias de *T. suis*, *T. colobae* y *T. ursinus*, todo esto sustentado por un alto porcentaje de soporte en rama.

Por lo tanto, viendo los diferentes árboles filogenéticos (Figuras 13 y 14), y los estudios biométricos de adultos, se podría decir que las muestras estudiadas en el presente trabajo corresponderían a *T. trichiura*.

Existe la posibilidad de que estos parásitos infecten y causen enfermedades en humanos, ya que existe un potencial zoonótico y presentan una proximidad filogenética con el hombre que plantea desafíos crecientes para la salud pública, especialmente cuando los NHP se utilizan como mascotas, o viven en libertad (como es el caso de *M. sylvanus* en Gibraltar).

Por lo tanto, la transmisión de monos al hombre debe considerarse como un nuevo problema de salud pública en estas regiones.

5. Conclusiones

1. Tras el estudio epidemiológico llevado a cabo en siete zoológicos de España podemos concluir que los primates que viven en cautividad están parasitados por *Trichuris* spp., con una prevalencia del 7 %.
2. Tras el estudio biométrico de los huevos de *M. sylvanus*, se puede concluir que existe una variabilidad en las medidas de longitud y anchura de huevos de *Trichuris* sp. procedentes de *Macaca sylvanus*.
3. Tras el estudio biométrico de adultos de *Trichuris* sp. de *M. sylvanus*, se puede observar que las medidas más características, tanto en machos como en hembras, son más semejantes a *T. trichiura* que a las demás especies de *Trichuris* comparadas.
4. Tras el estudio molecular y filogenético, se ha visto que las muestras estudiadas están incluidas en el clado de *T. trichiura* y separadas por un alto soporte de rama de *T. suis*, *T. colobae* y *T. ursinus*.

Por todo ello, podemos concluir que las muestras estudiadas en el presente trabajo, tanto a nivel biométrico como molecular, pertenecen a la especie *T. trichiura*.

6. Bibliografía

- Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organ. Panamericana la Salud. 2001;Vol. 1: Ba(580):76–252.
- Ash LR, Orihel TC. Atlas de parasitología humana. 5a. ed. Í. Buenos Aires ; Madrid [etc.] : Médica Panamericana; 2010.
- Baruch WLA. Capítulo 31. Trichuriasis (tricocefalosis). Parasitol. humana. McGraw-Hill Interamericana; 2000. p. 804.
- Barus V, Kotrla B, Tenora F. A scanning electron microscopic study of spicular sheath of some trichurids (Nematoda). Folia Parasitol. (Praha). 1977;24(2):107–10.
- Barus V, Kotrlá B, Tenora F. Scanning electron microscopic study of the vulva of some trichurids (Nematoda). Folia Parasitol. (Praha). 1978. p. 31–4.
- Beer R. The relationship between *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* (Schrunk 1788) of the pig. Res. Vet. Sci. 1976a. p. 47–54.
- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. Lancet. 2006;367(9521):1521–32.
- Bruce MJVBC. Tropical diseases, Paper no. 2, 6pp. 1993.
- Butynski TM, Kingdon J, Kalina J. Mammals of Africa. Bloom. Publ. London, United Kingdom. 2013.
- Callejón R. Taxonomía, filogenia y filogeografía del género *Trichuris* (Roeder, 1761) (Tesis Doctoral). 2012.
- Callejón R, Halajian A, Cutillas C. Description of a new species, *Trichuris ursinus* n. sp. (Nematoda: Trichuridae) from *Papio ursinus* Keer, 1792 from South Africa. Infect. Genet. Evol. 2017;51:182–93.
- Callejón R, Nadler S, De Rojas M, Zurita A, Petrášová J, Cutillas C. Molecular characterization and phylogeny of whipworm nematodes inferred from DNA sequences of *cox1* mtDNA and 18S rDNA. Parasitol. Res. 2013;112(11):3933–49.
- Chandler A. Specific characters in the genus *Trichuris* with a description of the new species *Trichuris tenuis* from a camel. J Parasitol. 1930;16:198–206.
- Creplin FC. Observaciones de Entozoos (Gryphisw). 1825.
- Cutillas C, Callejón R, de Rojas M, Tewes B, Ubeda JM, Ariza C, et al. *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. Acta Trop. Elsevier; 2009 Sep 1;111(3):299–307.
- Cutillas C, De Rojas M, Callejón R. *Trichuris*. Molecular detection of human parasitic pathogens. 2012. p.709–21.

- Cutillas C, Rojas M De, Zurita A. *Trichuris colobae* n . sp . (Nematoda : Trichuridae), a new species of *Trichuris* from *Colobus guereza kikuyensis*. 2014;2725–32.
- Dolezalova J, Obornik M, Hajduskova E, Jirku M, KJ P, Bolechova P, et al. How many species of whipworms do we share? Whipworms from man and other primates form two phylogenetic lineages. *Folia Parasitol. (Praha)*. 2015.
- Dujardin F. Histoire naturelle des helminthes. Planches des helminthes / ou vers intestinaux. 1845.
- Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C elegans*. *Cell. Cell Press*; 1986 Mar 28;44(6):817–29.
- Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* (N. Y). 1985;39(4):783.
- Foreyt WJ. Diagnostic Parasitology. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. Elsevier*; 1989 Sep 1;19(5):979–1000.
- Gagarin V. Critical evaluation of measured characters in the differentiation of helminth species (on the model of trichocephalids). In: Tokobaev MM, editor, *Fauna gelmintov zivotnych y rastenij kirgizii*. 1974. Frunze: ILIM, pp. 3-9.
- Gállego J. Manual de parasitología : morofología y biología de los parásitos de interés sanitario. Barcelona: Universitat de Barcelona, Publicacions i edicions; 2007.
- García P, Fernández MT, Paredes F. Microbiología clínica práctica. Cádiz: Universidad, Servicio de Publicaciones; 1993.
- Gibbons LM. SEM guide to the morphology of nematode parasites of vertebrates. Commonweal. Slough: C.A.B. International; 1986.
- Glen DR, Brooks DR. Parasitological evidence pertaining to the phylogeny of the hominoid primates. *Biol. J. Linn. Soc.* 1986;27(4):331–54.
- Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009. p. 127–127–45, Table of Contents.
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 2003.
- Haiegwa M. Parasites of the Kenya baboon: Arthropods, blood protozoa and helminths. 1983;Primates,:75–82.
- Hira JK, Koyama E, Coe M. The helminth parasites of non-human primates and man. *Lab. Anim. care* 20(5). 1963;Part II:395–401.
- Horii Y, Usui M. Experimental transmission of *Trichuris* ova from monkeys to man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985. p. 423.
- Huelsenbeck JP, Rannala B. Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an

- evolutionary context. *Science* (80-.). 1997;276(April):227–32.
- John DT, Petri WA, Markell EK, Voge M, Markell EK. *The Intestinal Nematodes*. Markell Voge's Med. Parasitol. 9th ed. St. Louis : Saunders Elsevier; 2006. p. 263–6.
- Khuroo M, Khuroo N. *Trichuris* dysentery syndrome: a common cause of chronic iron deficiency anemia in adults in an endemic area (with videos). *Gastrointest. Endosc.* 2010. p. 200–4.
- Knight RA. Redescriptions of *Trichuris discolor* (Von Linstow, 1906) and *T. skrjabini* (Baskakov, 1924) from Domestic Ruminants in the United States and Comparisons with *T. ovis* (Abildgaard, 1795). *J. Parasitol.* 1971.
- Lanfredti RM, De Souza W, Gomes DC. Comparative study of four species of *Trichuris* roederer, 1761 (Nematoda, Trichurinae) by scanning electron microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1995;90(4):489.
- Lapage G. *Parasitología veterinaria*. 8a reimp. México : CECSA; 1983.
- Leuckart R. Cited by Schwartz (1926). 1876.
- Liu GH, Gasser RB, Nejsum P, Wang Y, Chen Q, Song HQ, et al. Mitochondrial and Nuclear Ribosomal DNA Evidence Supports the Existence of a New *Trichuris* Species in the Endangered François' Leaf-Monkey. *PLoS One.* 2013;8(6).
- Mahmoud LH. Scanning electron microscopy of *Trichuris trichura*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2002;32(2):469—474.
- Meslin FM. Zoonoses in the world: current and future trends. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1995. p. 875–8.
- Muchemi GG. Geology of the Olkaria Northeast field. Kenya Power Co. Intern. report, 27 pp. 1992.
- Mullis K, Faloona F. Specific enzymatic amplification of DNA li vitro: The polymerase chain reaction. *Methods Enzym.* 1987;155(Table 1):335–50.
- Munene E, Otsyula M, Mbaabu DAN, Mutahi WT, Muriuki SMK, Muchemi GM. Helminth and protozoan gastrointestinal tract parasites in captive and wild-trapped African non-human primates. *Vet. Parasitol.* 1998;78(3):195–201.
- Muriuki SMK, Murugu RK, Munene E, Karere GM, Chai DC. Some gastrointestinal parasites of zoonotic (public health) importance commonly observed in old-world nonhuman-primates in Kenya. *Acta Trop.* 1998;71:73–82.
- Ooi HK, Tenora F, Itoh K, Kamiya M. Comparative Study of *Trichuris trichiura* from Non-Human Primates and from Man, and Their Difference with *T.suis*. *J. Vet. Med. Sci.* 1993.
- Pavlovsky EN, Sondak VA. On the specific differences between the whip- worm of man and swine. *Parazitol. Sbo. Zool. Inst. AN SSSR* 13. 1951;35–44.

- Perry JN, Smith RH, Woiwod IP, Morse DR. Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control. B. Rev. 2001. p. 536–8.
- Ravasi DF, O’Riain MJ, Davids F, Illing N. Phylogenetic evidence that two distinct *Trichuris* enotypes infect both humans and non-human primates. PLoS One. 2012;7(8).
- Rickard LG, Bishop JK. Redescription of *Trichuris tenuis* Chandler, 1930, from llamas (*Lama lama*) in Oregon with a key to the species of *Trichuris* present in North American ruminants. J. Parasitol. 1991. p. 70–5.
- Robles MDR, Cutillas C, Panei CJ, Callejón R. Morphological and molecular characterization of a new *richuris* species (nematoda-Trichuridae), and phylogenetic relationships of *Trichuris* species of cricetid rodents from Argentina. PLoS One. 2014;9(11).
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science (80). 1988;239(4839):487–91.
- Sambrook J, Russell DW (David W. Molecular cloning : a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Schneider A. Cited by Schwartz (1926). 1866;
- Schwabe C. Veterinary Medicine and Human Health. 1984;3rd ed.
- Schwartz B. A possible new source of infection of man with *Trichuris*, with a consideration of the question of physiological varieties among helminths. Arch Schiffs-u Trophyg. 1926;9:544–77.
- Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. J. Comp. Pathol. Ther. Elsevier; 1923;36:266–75.
- Sondak V. On the question of species independence of whipworms of man and swine. Parazitol. Sbo. Zool. Inst AN SSSR 10. 1948;195–204.
- Špakulová M, Lýsek H. A biometric study of two populations of *Trichocephalus suis* Schrank, 1788 from swine and wild boars. Helminthologia. 1981;18:91–98.
- Summers RW, Elliot DE, Urban JF, Thompson R, Weinstock J V. *Trichuris suis* therapy in Crohn’s disease. Gut. 2005;54(1):87–90.
- Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban Jr JF, Thompson R, Weinstock J V. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. Am. J. Gastroenterol. The American College of Gastroenterology; 2003 Sep 1;98:2034.
- Suriano DM, Navone GT. Three new species of the genus *Trichuris* Roederer, 1761 (Nematoda: Trichuridae) from Cricetidae and Octodontidae rodents in Argentina. Res. Rev. Parasitol. 1994;54(1):39–46.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary

- genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011;28(10):2731–9.
- Tenora F, Hovorka I, Hejlková D. A supplement to the scanning electron microscopy of some *Trichocephalus* spp. (Nematoda). 1988;25:227–34.
- Tenora F, Ooi HK, Stanek M, Kamiya M. Some novel features of male posterior end of *Trichuris discolor* as revealed by scanning electron microscopy. *Japanese J. Parasitol.* 1992 Aug 1;41(6):487–91.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673–80.
- Warren KS. The global impact of parasitic diseases. *Biol. Parasit.* Alan R.L., New York. 1988;3–12.
- WHO. Ominous Trends for Infectious Diseases. World Heal. Report, WHO, Geneva. 1996.
- Wilson DE, Reeder DM. Mammal Species of the World: A taxonomic and geographic reference by D. E. Wilson; D. M. Reeder. *J. Mammal.* 2005 Jun 1;88(3):824–30.
- Yoshikawa H, Yamada M, Matsumoto Y, Yoshida Y. Variations in egg size of *Trichuris trichiura*. *Parasitol. Res.* 1989.
- Zaman V. Scanning electron microscopy of *Trichuris trichiura* (Nematoda). *Acta Trop.* 1984;41(3):287–292.